

호알카리성 *Bacillus* sp. 4830이 생산하는 *Streptococcus mutans* 세포벽 분해효소의 분리와 특성

김윤근 · 배동훈*

단국대학교 식품공학과

Production and Characteristics of Lytic Enzyme against *Streptococcus mutans* Cell Wall from Alkalophilic *Bacillus* sp. 4830

Yun-Keun Kim and Dong-Hoon Bai*

Department of Food Engineering, Dankook University

To elucidate a method of preventing dental caries, strains producing lytic enzymes were isolated and their characteristics were investigated. Among 5,000 alkalophilic strains isolated from soil, 22 strains showed lytic activity against *Streptococcus mutans*. Strain No. 4830, with the highest lytic activity, was selected for further study. Strain 4830 showed 94% sequence homology with the 16S rDNA sequence of *Bacillus alcalophilus*, but it was concluded to be different from *Bacillus alcalophilus* because of its biochemical characteristics. The strain was named *Bacillus* sp. 4830. The lytic enzyme from *Bacillus* sp. 4830 was purified by ethanol precipitation and CM agarose column chromatography. The molecular weight of the lytic enzyme was determined to be 28 kDa by SDS-PAGE. The lytic enzyme was stable between pH 5.0 and pH 11 and up to 40°C. The optimal pH and temperature for the lytic activity was 9.0 and 50°C, respectively.

Key words: *Streptococcus mutans*, lytic enzyme

서 론

*Streptococcus mutans*는 비윤동성의 Gram 양성 구균으로 통성혐기성균의 특성을 가지고 있다⁽¹⁾. *S. mutans*는 일반적으로 구강내에 널리 서식하며 치아 우식증을 유발시키는 것으로 알려져 있다⁽²⁻⁷⁾. 치아우식증이란 구강 미생물에 의하여 치아 구조의 손상이 일어나는 질환으로 구강 미생물과 sucrose와 같은 기질의 상호 작용으로 발생하는 것으로 알려져 있다^(1,8). 여러 종류의 구강 미생물 중 *Streptococcus*속은 치석 형성에 주된 역할을 하며 특히 *S. mutans*는 치아우식증 형성에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁽²⁾.

한편, 인체는 구강 미생물에 대한 자가방어 능력을 가지고 있다. 이는 주로 침에 의하여 이루어지며 침은 세척작용과 lysozyme⁽⁶⁾, peroxidase, immunoglobulin 등을 함유하며 이들에 의하여 미생물의 생육이 저해된다⁽⁹⁾. 또한 침은 buffer의 역할을 하여 구강내의 pH를 일정하게 유지하여 치아우식증을 억제하게 된다. 따라서 침이 부족한 사람은 치아우식증에

걸릴 확률이 높아지며 그 외에도 스트레스, alcohol, 담배, 당분함유 음식 등의 요인에exposed to 인하여도 자가 방어 능력이 떨어져 치아우식증을 유발하게 되는 것으로 보고되고 있다^(9,10). 따라서 자가 방어 능력을 보조하기 위하여 불소 요법⁽¹¹⁾, 원인균들의 생육과 환경을 저해하기 위한 항생제 사용, 치석을 제거하기 위한 효소를 사용하여 충치를 막는 방법과 sucrose와 같은 당류를 대신하여 당알콜을 사용하는 방법도 있다.

*S. mutans*의 세포벽은 group-specific C-polysaccharide, protein, peptidoglycan의 세 부분으로 나누어져 있다⁽¹²⁾. Hardie와 Bowden은 *S. mutans*가 다양한 세포벽 성분을 가지고 있어, 용균 효소가 peptidoglycan에 작용하는 것이 어렵다는 보고를 하였으며, lysozyme 등도 작용이 어려운 것으로 보고되었다⁽¹³⁾. 한편, Yokogawa 등⁽¹⁴⁾은 *S. mutans*에 대한 용해 작용을 갖는 mutanolysin⁽¹⁵⁾을 분리한 바 있으나, 이 경우 구강 세포에 대한 독성이 알려져 그 사용에 제한을 받게 되었다.

이와 같이 *S. mutans*에 특이적으로 작용하는 용균 효소를 사용하게 되면 *S. mutans*에만 적접적으로 그 영향을 미치게 되어 인체에 대하여는 상대적으로 안전함에도 불구하고 *S. mutans*에 특이적으로 작용하는 용균 효소에 대한 연구는 미미한 상태에 불과하다. 따라서 본 연구에서는 *S. mutans*에 특이적으로 작용하는 용균 효소를 분리할 목적으로 특수환경인 호알칼리성 조건에서 생육하는 미생물들을 자연계로부터

*Corresponding author : Dong-Hoon Bai, Department of Food Engineering, Dankook University, Chunnam, Chungnam 330-714, Korea
 Tel: 82-41-550-3562
 Fax: 82-41-550-3566
 E-mail: baidh@dku.edu

분리하였고 이들 호알칼리성 미생물들중 *Streptococcus mutans*에 대한 용균 활성이 높은 미생물을 발견하여 균주를 동정하였으며 본 균주가 생산하는 효소를 정제하여, 그 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

배지 및 균주 선별

토양으로부터 호알카리성 미생물을 분리하기 위하여 Horikoshi I 배지(Polypeptone 5 g/L, Yeast extract 5 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L, Glucose 10 g/L, Na₂CO₃ 10 g/L, Agar 10 g/L)를 분리 배지로 사용하였다⁽¹⁶⁾.

Streptococcus mutans 세포벽 용해효소를 탐색하기 위하여 *S. mutans*가 혼탁된 평판 배지에 토양현탁액을 균일하게 도말하였다. 30°C 배양기에서 1~3일간 배양하여 형성된 균락 주위에 투명환이 형성된 균주를 용균 활성을 갖는 균주로 일차 선정하였다. 선정된 용균활성 균주들을 Horikoshi I 액체 배지를 사용하여 30°C에서 3일간 진탕배양 후, 100 μL의 배양상등액을 취하여 paper disc에 가하고 30°C에서 24시간 반응시킨 후 disc 주변의 clear zone을 측정하고 배양 상등액의 용균효소의 상대적인 활성을 측정하여 그 중 가장 활성이 높은 균주를 2차적으로 선정하였다.

기질의 조제

효소 활성의 측정에 사용한 기질균주인 *S. mutans*는 Brain Heart Infusion 배지를 이용하여 37°C에서 3일간 정치배양한 후 8000×g(Hanil Supra 22K)에서 20분간 원심 분리하여 균체를 모은 후 0.8%(w/v) NaCl 용액으로 2회 세척한 후 적당량의 생리식염수에 다시 혼탁하여 -20°C에서 냉동 보관하여 효소 활성 측정에 사용하였다.

용균 효소활성의 측정

세포벽 용해 효소의 활성 측정은 Hayashi⁽¹⁷⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. -20°C에 보관중인 기질을 600 nm에서 흡광도가 1.0이 되도록 50 mM Tris-HCl완충용액(pH 9.0)에 혼탁시킨 후 이 균체 혼탁액 2.9 mL에 효소액 100 μL를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 600 nm에서의 흡광도 감소를 측정하였다. 이 때 효소 활성도 1 unit는 1분 동안 600 nm에서의 흡광도를 0.001감소시키는 효소의 양으로 정의하였다.

효소의 분리 및 정제

효소 생산 균주의 배양액을 8,000×g(Hanil Supra 22K)로 20분간 원심분리하여 균체를 제거하였다. 상등액을 유기용매로 침전한 후 0°C에서 감압 건조에 의하여 유기용매를 회발시켰다. 건조 효소분말을 10 mM phosphate완충액(pH 6.6)에 충분히 용해 시킨 후 12,000×g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 이들을 10 mM phosphate 완충액(pH 6.6)으로 평형화시킨 CM-agarose(Sigma Co.)에 흡착시키고 NaCl 농도구배를 이용하여 활성을 지닌 효소분획을 용출시켰다. 활성을 지닌 분획은 모아서 PM-10 membrane을 사용하여 농축한 후 50 mM Na-phosphate buffer에 대하여 충분히 dialysis하였다. 이렇게 얻어진 효소분획은 10 mM phosphate완충

액(pH 6.6)으로 평형화된 Sephadex G-75(Sigma Co.)를 사용하여 분자량에 따라 Gel filtration법에 의하여 분리하였다.

환원당 및 단백질 농도의 측정

환원당 정량은 Miller⁽¹⁸⁾의 방법을 변형하여 수행하였으며 단백질의 농도는 UV-1201 UV-VIS Spectrophotometer(Shimadzu Co. Japan)를 이용하여 Bradford⁽¹⁹⁾법에 준하여 측정하였다.

미생물의 동정

균주의 형태적 생화학적 특성은 Bergey's manual of systematic bacteriology⁽²⁰⁾와 Biochemical tests for identification of medical bacteria⁽²¹⁾에 준하여 시행을 하였다. 균주의 형태학적인 특성은 그람 염색 후 광학현미경에 의한 관찰과 주사전자현미경(SEM)에 의한 관찰법으로 확인하였다.

균주의 총세포 지방산 조성을 확인하기 위하여 MIDI사의 gas chromatography(GC, HP 6890)를 사용하였다. 표준 지방산으로는 HP(Hewlett-Packard)사에서 제공하는 표준 지방산(calibration standard kit)을 사용하였으며 균주의 배양은 Horikoshi I agar 배지와 trypticase soy agar(BBL)에 Na₂CO₃ 1%를 첨가한 배지를 사용하여 30°C에서 24시간동안 배양하여 분석용 시료로 하였다. 분석용 시료는 GC를 사용하여 분석 후 MIDI사의 균주 동정 프로그램인 Sherlock을 통하여 분석하였다.

분리 균주의 16S rDNA를 분석하기 위하여 균체를 Horikoshi I broth로 30°C, 250 rpm으로 진탕배양하였다. 원심분리하여 균체를 회수한 후 chromosomal DNA를 lysozyme-sodium dodecyl sulfate-proteinase K 방법으로 추출하였다. 분리된 chromosomal DNA를 template로 사용하여 Polymorase Chain Reaction(PCR)을 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 (forward primer; Eubacterial 27F: 5'-AGAGTTGATCMTG-GCTCAG-3', reverse primer; Universal 1492R: 5'-GGYTAC-CTTGTACGACTT-3')를 사용하였다. PCR은 최종 볼륨이 50 μL 되게 하여 10 μL의 template DNA(50 ng/μL), 5 μL의 10 × reaction buffer(100 mM Tris · HCl, 400 mM KCl, 500 μg/mL BSA, pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 5 μL deoxynucleoside triphosphates(2.5 mM each), 각각 100 pmol primers, 2.5 U Taq polymerase 반응물을 thermocycler(ABI Prism 310, Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 94°C에서 4분간 반응하였으며 이후 30 cycles은 94°C에서 2분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분의 순으로 행하였으며 최종적으로 72°C에서 10분간 중합반응을 행하였다. PCR산물은 0.8% agarose gel에서 크기를 확인하였다. 확인된 PCR product는 Bio101 Gene cleaning kit(Bio rad, USA)로 세척후 pGEM-T vector(Promega Co.)에 삽입후 ALF Red automated DNA sequencer(Pharmacia, Uppsala, Sweden)와 M13 universal primers를 사용하여 약 1,500개의 nucleotide 염기서열을 확인하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

전국의 가지로부터 수집한 토양으로부터 Horikoshi 배지를 사용하여 5,000여주의 내알카리성 미생물들을 분리한 후 이

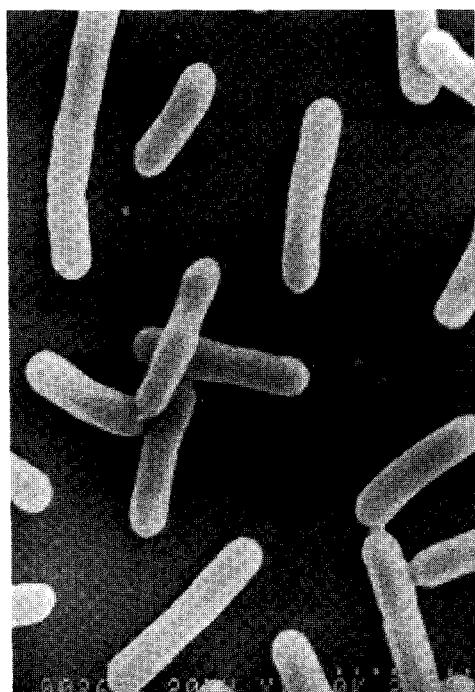


Fig. 1. Scanning electron micrograph of the strain No. 4830.

들을 *S. mutans*에 대하여 용균활성을 가지는 균주 선별에 사용하였다. *S. mutans*에 대하여 용균활성을 갖으나 항생물질 등을 생산하는 균주를 배제하기 위하여 100°C에서 10분간 중탕하여 열처리한 *S. mutans*를 혼탁한 한천배지에 토양 혼탁액을 도말하여 배양하였다. 배양된 균주 중 *S. mutans*에 용균활성을 보인 균주 22주를 1차 선발하였다. 이들로부터 다시 생균에 대한 용균활성을 확인하기 위하여 4°C에 보관한 *S. mutans*를 혼탁한 한천배지에 용균활성 균주를 접종하여 배양시킨 후 생균에 대한 용균활성을 확인하였다. 생균에 대한 용균효소 활성을 확인한 균주는 다시 액체 배양하여 paper disc 방법에 의하여 배양 상등액에 효소 분비여부를 확인하였다. 4°C에 보관한 *S. mutans*를 도말한 배지에 배양 상등액 100 μL를 흡수 시킨 paper disc를 위치하여 disc의 주변에 생기는 용균환을 측정하여 가장 큰 균주를 선정하여 strain No. 4830이라고 명명하였다.

균주의 동정

호알카리성 strain No. 4830 균주는 전자현미경을 사용하여 관찰해 본 결과 0.5×2.5~4 μm 정도의 크기를 가지는 간균의 형태를 하고 있었다 (Fig. 1). 그람 양성세균으로 운동성을 가지며 20~40°C에서 생육하고 NaCl 15%이하의 농도에서는 양호한 균체의 생육을 보였다. 탄수화물을 이용하여 실험한 결과 Strain No. 4830는 산을 형성하지 않았다. Casein, gelatin, starch 분해능을 보유하고 있으며 catalase 양성균, oxidase는 음성이었다(Table 1). Strain No. 4830의 총세포 지방산 조성은 Table 2에 보인 바와 같이 C_{13:0} ISO 0.4%, C_{14:0} ISO 5.2%, C_{14:0} 3.3%, C_{15:0} ISO 41.0%, C_{15:0} ANTEISO 21.6%, C_{15:0} 3.3%, C_{16:1} 6.0%, C_{16:0} ISO 2.9%, C_{16:0} 6.1%, C_{17:1} ISO 0.3%, C_{17:0} ISO 5.6%, C_{17:0} ANTEISO 3.8%, C_{17:0}

Table 1. Biochemical and physiological properties of *Bacillus* sp. 4830

	<i>Bacillus alcalophilus</i>	<i>Bacillus</i> sp. 4830
Color of colonies		yellowish white
Form	rods	rods
Motility	+	+
Spore formation	+	+
Gram staining	+	+
Catalase	+	+
Oxidase		-
Indole production	-	-
H ₂ S production		-
H ₂ S production (pH 7.0)	-	-
Growth at 10°C	-	-
20°C	+	+
30°C	+	+
40°C	+	+
50°C	-	-
Acid produced from:		
D-glucose	+	-
D-xylose	+	-
fructose		-
mannose		-
lactose	+	-
melibiose		-
sorbitol	+	-
L-arabinose	+	-
rhamnose		-
sucrose	+	-
cellobiose		-
galactose		-
glycerol	+	-
maltose	+	-
sorbose		-
D-mannitol	+	-
Hydrolysis of casein	+	+
gelatin	+	+
starch	+	+
Growth in		
0% NaCl		+
2~10% NaCl	-	+ (~15%)
Nitrate reduction	-	-

0.5%으로 탄소수 15개의 지방산의 함량이 63.5%와 탄소수 17개의 지방산 함량이 10.2%로 *Bacillus* 계열과 유사하였으나 탄소수 16개의 비율이 15.0%로 중성조건의 *Bacillus* 계열과는 차이를 나타내었다. 또한 MIDI system의 data base와 비교 검색한 결과는 *Bacillus* 계열로 동정되었다.

호알카리성 strain No. 4830의 16S rDNA sequence를 분석한 결과 1,506 bp를 확인하였으며 이를 GenBank에서 유사성을 검증한 결과 *Bacillus alcalophilus* type strain과 94%의 유사성을 보였다(Fig. 2). 그러나 균주의 생화학특성에서 *Bacillus alcalophilus*와 달리 산을 생성하지 않으며 내염성등의 차이가 있었다. 또한 아직 alkalophilic *Bacillus*에 대한 정

Table 2. Cellular Fatty acid composition of *Bacillus* sp. 4830

Fatty acid composition	(%)
C _{11:0}	5.5
C _{14:0 ISO}	3.3
C _{15:0 ISO}	28.4
C _{15:0 ANTEISO}	35.4
C _{16:0 ISO}	4.9
C _{16:0}	4.8
C _{17:0 ISO}	6.8
C _{17:0 ANTEISO}	11.0

확한 분류체계가 확립되어 있지 않으므로 호알카리성 Strain No. 4830은 잠정적으로 호알카리성 *Bacillus* sp. 4830으로 명명하였으며 균종간의 유의성은 Genbank에 등록된 균주의 16S rRNA를 사용하였다.

효소의 생산

Strain No. 4830은 pH 10에서 최대 생육과 효소 생산을 하였으며 탄소원으로는 glucose 1%에서 최대 효소 생산을 하는 것으로 나타났으며 전반적으로 단당류를 탄소원으로 하였을 때 이당류보다 높은 효소활성을 보였다. 질소원으로는 yeast extract를 1% 첨가하였을 때 최대로 효소를 생산하였다 (실험결과 제시하지 않음).

최적화 된 효소 생산 조건(yeast extract 1%, glucose 1%, Na₂CO₃ 1% K₂HPO₄ 0.1%)으로 strain No. 4830 균주를 280 rpm으로 진탕 배양하면서 균주의 생육과 효소의 생산 및 pH의 변화와 잔당량 변화를 경시적으로 관찰한 결과(Fig. 3) 균의 생육은 접종 후 3시간 후부터 점차적으로 증가하여 13시간이후에는 stationary phase에 도달하여 배양 70시간까지 일정한 생육을 유지하였다. 발효액의 pH는 균체 생육에 따라 배양초기에 pH가 낮아지지만 균체 생육이 stationary phase에 도달하면서 pH가 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 효소 생산은 접종 후 9시간 후부터 생산되는 것을 확인하였으며 접종 42시간 후에 최대 효소 생산을 확인하였다. 또한 배양 상등액의 단백질의 농도 변화는 배양 상등액에서의 효소 활성변화와 동일한 경향을 보이고 있었다.

효소의 분리 및 정제

Strain No. 4830이 생산하는 세포벽 용해 효소를 분리, 정제하기 위하여 5 L jar fermenter(Korea fermenter Co., LTD)를 사용하였다. 배양 상등액으로 부터 효소를 회수하기 위하여 8,000×g에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거한 배양 상등액에 ethanol을 가하고 4°C에서 2시간 방치후 침전된 단백질을 감압건조하여 사용하였다. Ethanol에 의하여 침전된 효소를 10 mM pH 6.6 sodium phosphate buffer로 용해시켰다. 혼탁액은 cellulose membrane으로 4°C에서 동일한 원총 액에 대하여 충분히 투석하여 사용하였다. 또한 동일 pH로 평형화 된 CM-agarose column에 10 mM pH 6.6 sodium phosphate buffer에 용해된 조효소액을 흡착 시켰다. 활성 부분을 1 M NaCl로 용출한 결과 30~45 fraction(Fig. 4)에서 효소활성을 나타내는 부분이 용출되어 이 부분을 모아 PM-10

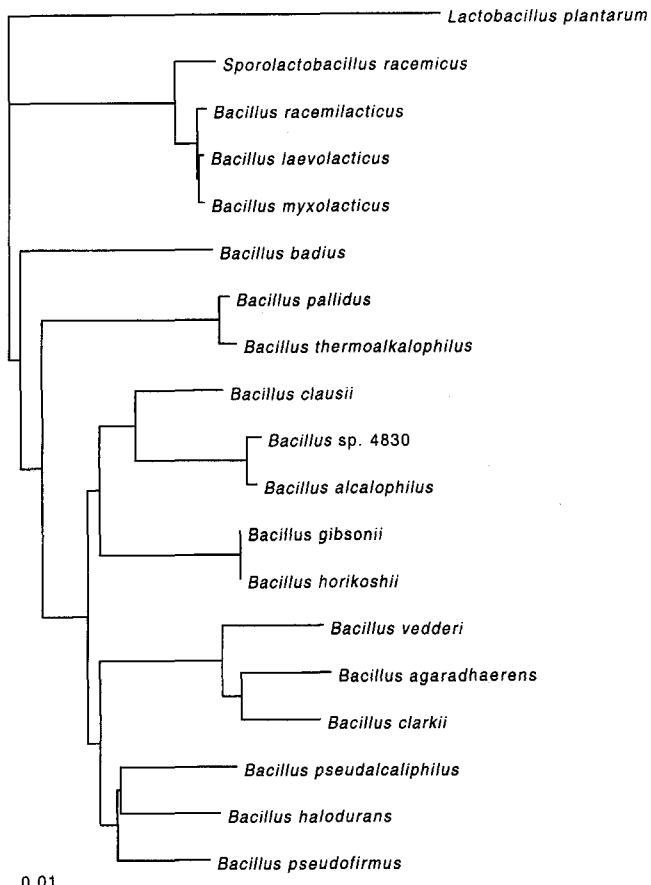


Fig. 2. Dendrogram of the alkalophilic *Bacillus* sp. 4830 through 16S rDNA gene sequence homology, Scale bar, 0.01 estimated substitution per nucleotide position.

The GenBank nucleotide sequence accession numbers for the organisms used are follows: *Bacillus alcalophilus*, AF078812; *Bacillus halodurans*, AJ302709; *Bacillus pseudocaliphilus*, X76449; *Bacillus gibsonii*, X76446; *Bacillus horikoshii*, X76443; *Bacillus pseudofirmus*, X76439; *Bacillus clausii*, X76440; *Bacillus agaradhaerens*, X76445; *Bacillus badius*, X77790; *Bacillus clarkii*, X76444; *Bacillus laevolacticus*, D16270; *Bacillus myxolacticus*, D16274; *Bacillus pallidus*, Z26930; *Bacillus racemilacticus*, D16279; *Bacillus thermoalkalophilus*, Z26931; *Bacillus vedderi*, Z48306; *Sporolactobacillus racemicus*, D16291; *Lactobacillus plantarum*, AB025972.

(Amicon Co. USA) membrane을 사용하여 농축하여 Sephadex G-75를 이용하여 정제하였다. 한편으로 정제효소의 순도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 행하였다. 그 결과 분자량 28,000 daltons의 위치에서 정제된 단일 band를 확인할 수 있었다(Fig. 5). 대부분의 효소의 경우 DEAE계열의 음이온 교환수지에 잘 흡착되는 경향을 보이나 본 효소는 중성 부근의 pH에서 음이온 교환수지에는 흡착이 되지를 않고 CM계열의 양이온 교환수지에 흡착되어 Table 3에서 보이는 바와 같이 ethanol 침전과 이온교환수지에 의한 단순한 정제과정을 통하여 2.3배의 정제도를 얻었으며 그 결과는 전기영동상에서 단일 band의 순수한 단백질을 얻을 수 있었다. 이후 Sephadex G-75를 사용하여 정제를 진행하였으나 Table 3과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 더 이상의 정제효과는 얻을 수 없었다.

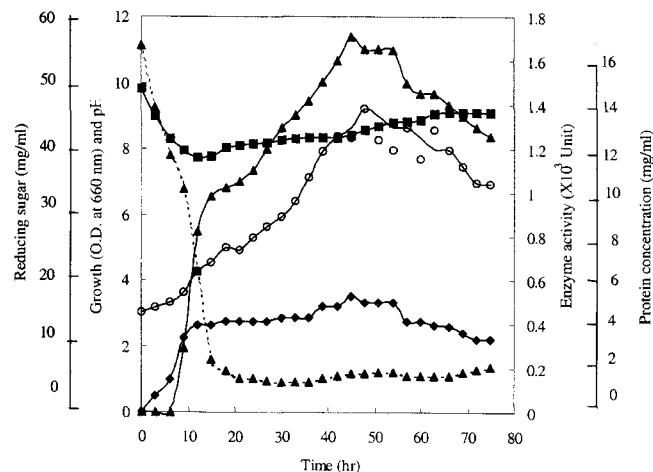


Fig. 3. Profile of cell growth (◆), pH (■), reducing sugar content (△), protein concentration (○), and enzyme activity (▲) during batch culture.

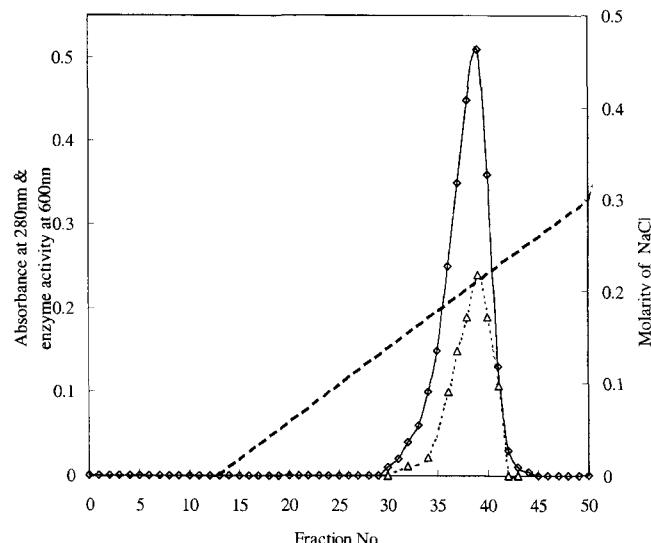


Fig. 4. Chromatogram of lytic enzyme from strain No. 4830 on CM-agarose column.

효소의 물리적 성질

효소는 pH 7.0 이상에서 용균활성을 나타내었으며 pH 9.0에서 최대활성을 나타냄을 확인하였으며 효소의 pH에 대한 안정성은 pH 5~11의 중성 및 알칼리 영역에서는 안정한 효소활성을 보였으나 pH 5.0이하의 영역에서는 상대적으로 불안정한 활성을 보였다(Fig. 6).

Fig. 7에서 나타난 바와 같이 30°C 이상에서부터 효소 활성을 나타내었으며 50°C에서 최대 효소 활성을 확인하였다

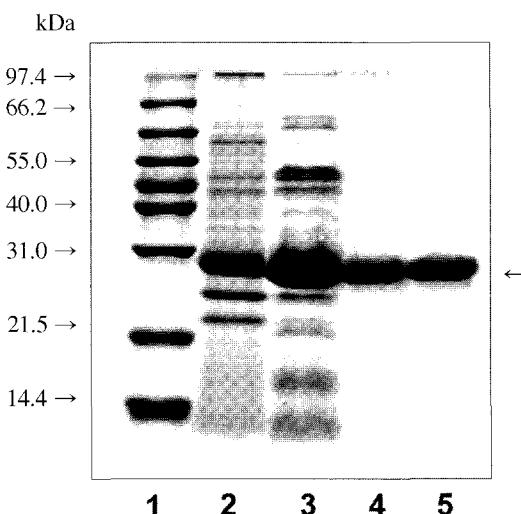


Fig. 5. SDS-PAGE of lytic enzyme from strain No. 4830.

1 lane 1, protein marker; lane 2, culture broth; lane 3, ethanol precipitation; lane 4, CM-agarose chromatography; lane 5, Sephadex G-75 chromatography.

또한 50°C 이상에서는 효소의 활성이 급격히 감소하는 것을 확인하였으며 효소의 열안정성은 30°C 이하에서는 효소의 잔존활성이 안정하게 유지 되었으나 40°C부터는 잔존효소의 활성이 급격히 낮아지는 것으로 보아 본 효소는 40°C 이상의 온도에서는 불안정한 효소임을 알 수 있었다. 이러한 물리화학적 특성은 Yeo⁽²²⁾ 등이 보고한 효모 세포벽 용해효소와 비슷한 성질을 보이고 있으나 본 효소는 Yeast의 세포벽에 대한 용해 활성을 보이지 않았으며 또한 생산 균주의 지방산 조성과 16S rRNA의 구조에 있어 상이함을 보였다. 이에 대한 보다 자세한 것은 향후 정제효소의 일차구조에 대한 비교 연구를 통하여 규명될 수 있을 것으로 생각된다.

요약

본 연구는 *Streptococcus mutans*를 특이적으로 용균하는 효소를 탐색하고 효소생산 균주의 동정을 수행하였다. 토양으로부터 5,000여주의 알칼리 내성 균주를 선별하였으며 그 중 용균활성이 있는 22주를 선별하였으며 가장 용균활성이 높은 균주 1주를 선별하여 Strain No. 4830이라 명명한 후 효소의 생산 조건 및 효소의 특성을 확인한 결과 pH 5에서부터 pH 11에서 안정하였으며 pH 7.0 이상에서 *Streptococcus mutans*에 대하여 용균활성이 나타났다. 또한 30°C 이상에서 효소의 활성을 확인할 수 있었으며 50°C에서 최대 효소활성을 확인하였다. 효소의 열안정성은 40°C 이하에서

Table 3. Purification table of lytic enzyme from strain No. 4830

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold
Culture broth	277.8	3,016,000	10856.7	100	1
Ethanol precipitation	72	1,300,000	18055.5	43	1.67
CM-Agarose chromatography	35.16	894,500	25440.8	29	2.34
Sephadex G-75	32.16	818,400	25447.7	27	2.34

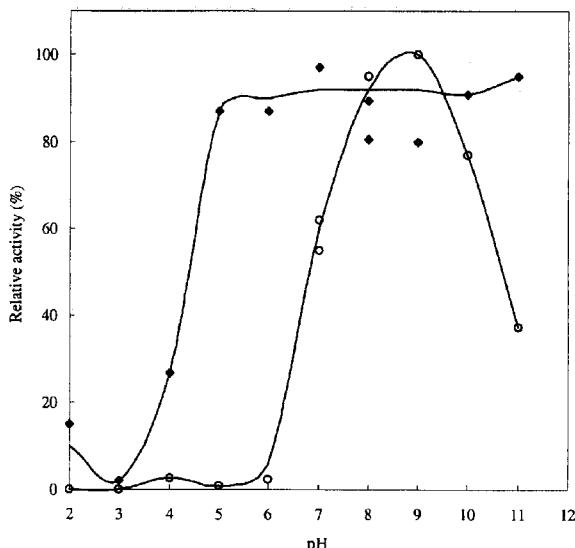


Fig. 6. Effect of pH on lytic enzyme activity (O) and stability (◆) from strain No. 4830.

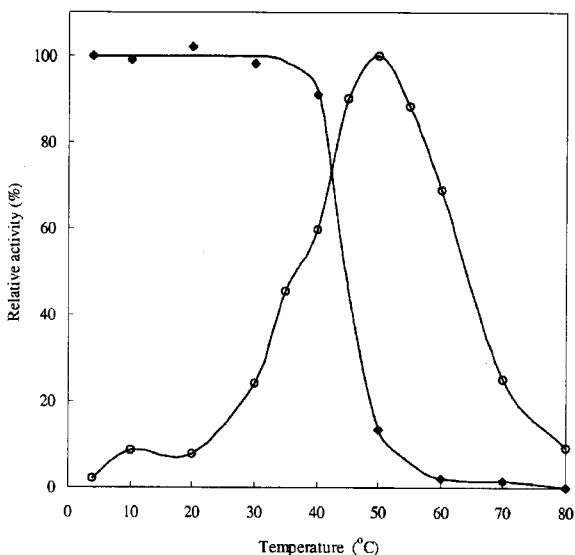


Fig. 7. Effect of temperature on lytic enzyme activity (O) and stability (◆) from strain No. 4830.

는 안정한 것으로 확인되었다. 균주의 특성을 검토한 결과 균체의 지방산 조성은 중성 조건에서 생장하는 *Bacillus* 계열⁽²³⁾과는 달리 16-C 계열의 지방산 함량이 상당히 높은 것을 확인하였으며 Obligate alkalophilic의 특성으로 알려진 branched 15-C 지방산인 iso-C_{15:0}와 anteiso-C_{15:0}의 함량⁽²⁴⁾이 매우 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 생화학적 특성으로 *Bacillus* 계열로 추정이 가능하였으며 다양한 종류의 당류에 대하여 acid를 형성하지 않은 것으로 확인되어 Strain No. 4830은 Obligate alkalophilic의 특성을 나타내었다. 또한 15% NaCl의 농도에서도 생장하는 것으로 보여 염에 대하여 내성을 갖는 것으로 나타났다. 16S rRNA 분석 결과 *Bacillus alcalophilus* 균주와 94%의 유사성을 나타내었으나 생화학적 및 이화학적인 특성 등에서 *Bacillus alcalophilus* 와 다른 균주로 동정되었다.

감사의 글

이 연구는 2003년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

문 헌

- Koga, T., Sato, S., Inoue, M., Takeuchi, K., Furuta, T. and Hamada, S. Role of primers in glucan synthesis by glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* strain OMZ176. *J. Gen. Microbiol.* 129: 751-754 (1983)
- Ernest, N.B. *Cariology*, 3rd ed.. Chi Won Publishing Co., Seoul, Korea (1989)
- Gibbons, R.J., Berman, K.S., Berman, P., Knoettner, H. and Kapsemalis, B. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rat infected with capsule forming streptococci of human origin. *Arch. Oral Biol.* 11: 549-560 (1966)
- Krasse, B. Human streptococci and experimental caries in hamsters. *Arch. Oral Biol.* 11: 429-436 (1966)
- Slots, J and Taubman, M. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. Mosby Yearbook, St. Louis, USA (1992)
- Stevens, J.E. and Desrocher, J. *Oral ecology. Technol. Rev.* 100: 48-54 (1997)
- Willert. *Essential Dental Microbiology*. Appleton & Lange, New York, USA (1991)
- Hamada, S., Gill, K. and Slade, H.D. Chemical and immunological properties of the type f polysaccharide antigen of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 14: 203-211 (1976)
- Baum, L., Phillips, R.W. and Land, M.R. *Textbook of Operative Dentistry*. W.B. Saunders Co., PA, USA (1985)
- Otake, S., Makimura, M. and Kuroki, T. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res.* 25: 438-443 (1991)
- Murray, J.J. *Fluorides and Oral Health*; WHO Expert Committee on Oral Health Status and Fluoride Use. WHO Technical Report Series 846 (1994)
- Slade, H. D. and Slamp, W.C. Peptidoglycan composition and taxonomy of group D, E, and H streptococci and *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 109: 691-695 (1972)
- Gibbons, R.J., De Stoppelaar, J.D. and Harden, L. Lysozyme insensitivity of bacteria indigenous to the oral cavity of man. *J. Dent. Res.* 45: 877-881 (1966)
- Yogokawa, K., Kawata, S., Nishimura, S., Ikeda, Y. and Yoshimura, Y. Mutanolysin, bacteriolytic agent for cariogenic streptococci: partial purification and properties. *Antimicrobial Agent Chemotherapy* 6: 156-165 (1974)
- Hamada, S., Torii, M., Kotani, S., Masuda, N., Ooshima, T., Yokogawa, K. and Kawata, S. Lysis of *Streptococcus mutans* cells with mutanolysin, a lytic enzyme prepared from a culture liquor of *Streptomyces globisporus* 1829. *Arch. Oral Biol.* 23: 543-549 (1978)
- Horikoshi, K. and Akiba, T. *Alkalophilic Microorganisms-A New Microbial world*. Springer-Verlag, Tokyo, Japan (1982)
- Hayashi, K., Kasumi, T., Kubo, N. and Tsumura, N. Purification and characterization of the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgersensis* H-46. *Agric. Biol. Chem.* 45: 2289-2300 (1981)
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent of determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428 (1959)
- Daniel, M.B. and Stuart, J.E. *Protein Methods*, pp. 50-55. Wiley-Liss, New York, USA (1991)
- Kreig, N.R. and Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, USA (1984)
- MacFaddin, J.F. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1990)
- Yeo, I.H., Han, S.K., Yu, J.M. and Bai, D.H. Isolation of novel

- alkalophilic *Bacillus alcalophilus* subsp. YB380 and the characteristics if its yeast cell wall hydrolase. J. Microbiol. Biotechnol. 8: 501-508 (1998)
23. Tcherpakov, E. and Gutnick, D.L. *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov. Marianna, Proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 239-246 (1999)
24. Yumoto, I., Yamazaki, K., Sawabe, T., Nakano, K., Kawasaki, K., Ezura, Y. and Shinano, H. *Bacillus horti* sp. nov., a new gram-negative alkaliphilic bacillus. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 565-571 (1998)

(2003년 7월 8일 접수; 2003년 11월 3일 채택)